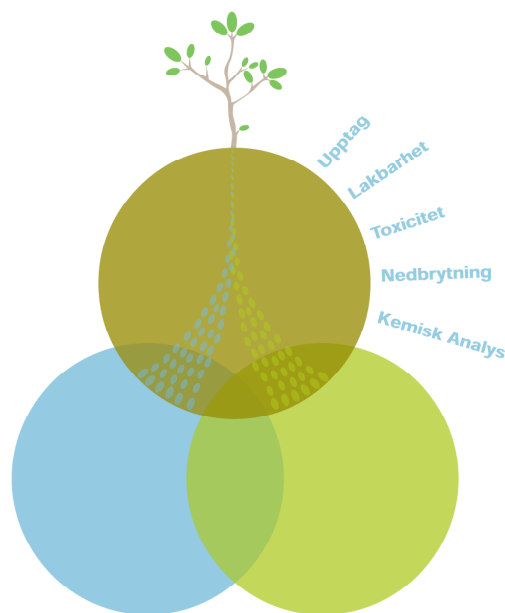




rapport

IVL Svenska Miljöinstitutet AB

Platsspecifik bedömning av förorenad mark - biologiska tester i kombination med kemiska analyser



Ann-Sofie Allard, Marianne Malmberg och Mikael Remberger

B1492

Stockholm, september 2002



Organisation/Organization IVL Svenska Miljöinstitutet AB IVL Swedish Environmental Research Institute Ltd.	RAPPORTSAMMANFATTNING Report Summary
Adress/address Box 21060 100 31 Stockholm	Projekttitel/Project title
Telefonnr/Telephone 08-598 563 00	Anslagsgivare för projektet/ Project sponsor IVL:s delkollektiva program
Rapportförfattare/author Ann-Sofie Allard Marianne Malmberg Mikael Remberger	
Rapportens titel och undertitel/Title and subtitle of the report Platsspecifik bedömning av förorenad mark - Biologiska tester i kombination med kemiska analyser	
Sammanfattning/Summary <p>Det finns många förorenade markområden i Sverige och varje område är unikt. Det är viktigt av miljömässiga och ekonomiska skäl att göra en riktig bedömning av dessa områden. Förutsättningarna för en adekvat riskbedömning är att relevanta metoder används för karakterisering av den förorenade jorden och att resultatet av denna karakterisering utgör grund för en platsspecifik bedömning.</p> <p>För att bidra till en säkrare riskbedömning har IVL utvecklat ett testsystem bestående av biologiska tester, kemiska analyser och laktester. De biologiska testerna är riktade mot aktuella föroreningars toxicitet, persistens och biotillgänglighet i förorenade markområden. Systemet bygger på naturligt förekommande marklevande organismer som testas under så realistiska förhållanden som möjligt. Föroreningarna kan ha olika effekter på de olika organismerna i marken. I testsystemet ingår därför bakterier, växter och dagmaskar som representerar flera nivåer i näringskedjan.</p> <p>De biologiska testerna har tillsammans med de kemiska analyserna används på ett antal förorenade jordar och rena substanser. Tester av grobarhet och rot- och skottillväxt har utförts med engelskt rajgräs, vitklöver och rädisa. Masken <i>Enchytraeus crypticus</i> har testats för toxicitet och reproduktionsstörningar. Undersökningar av metabolitbildning vid bakteriell omvandling av PAH'er har gjorts. Ett antal förberedande upptagstester med växter och maskar har utförts både med rena substanser och med en förorenad jord. Där det varit möjligt har resultaten från testerna jämförts med Naturvårdsverkets riktvärden.</p>	
Nyckelord samt ev. anknytning till geografiskt område eller näringsgren /Keywords förorenad jord, biologiska tester, växter, maskar, bakterier, kemiska analyser, platsspecifik riskbedömning, organiska ämnen, metaller	
Bibliografiska uppgifter/Bibliographic data IVL Rapport/report B 1492	
Beställningsadress för rapporten/Ordering address IVL, Publikationsservice, Box 21060, S-100 31 Stockholm fax: 08-598 563 90, e-mail: publicationservice@ivl.se	

Innehållsförteckning

Summary	3
1 Inledning	4
2 IVLs testpaket för bedömning av förorenad jord	5
3 IVLs biologiska testsystem	5
3.1 Testorganismer	6
3.1.1 Jordbakterier	6
3.1.2 Markfauna	6
3.1.3 Växter	6
3.2 Testmetoder	7
3.2.1 Toxicitet mot växter	7
3.2.2 Toxicitet mot maskar	7
3.2.3 Toxicitet mot jordbakterier	8
3.2.4 Omvandlingsförsök av PAH med bakterier	8
3.2.5 Upptag i växter	8
3.2.6 Upptag i maskar	9
4 Kemiska analyser	9
4.1 Växter	9
4.2 Jord	9
4.3 Maskar	10
4.4 Omvandlingsförsök med bakterier	10
4.5 Derivatiseringar	10
4.6 Instrument	11
4.6.1 Gaskromatografi	11
4.6.2 HPLC	11
5 Mätosäkerhet	11
6 Testmaterial	12
6.1 Testade jordar	12
6.2 Rena substanser	12
7 Resultat	12
7.1 Referensjordar	12
7.2 Kreosotförorenad jord	14
7.2.1 Biologiska tester	16
7.2.1.1 Växter	16

7.2.1.2 Maskar.....	19
7.3 Arsenik- krom- kopparförorenad jord.....	19
7.3.1 Resultat från tester med hela jordar	20
7.3.2 Resultat från tester med spädd jord.....	20
7.4 Jord spikad med skärvätska	21
7.4.1 Resultat växttester	21
7.4.2 Resultat masktester	21
7.5 Rena substanser.....	22
7.5.1 Grobarhet och rot- och skottillväxt.....	22
7.5.2 Masktest	24
7.6 Omvandlingsförsök med pyren och fluoranten.....	24
7.6.1 Pyren	25
7.6.2 Fluoranten	25
7.7 Upptag i växter.....	27
7.7.1 Resultat från upptagstester med rena substanser	27
7.7.2 Resultat från upptagstest med kreosotförorenad jord	28
7.7.3 Upptag i gräs från kreosotförorenad mark	30
7.8 Upptag i maskar	30
8 Sammanfattning och slutsatser	31
9 Tillkännagivanden	33
10 Referenser.....	33

Summary

There are substantial numbers of contaminated sites in Sweden. Each of these is unique and it is important from both an environmental and economic point of view to provide a comprehensive evaluation of these sites. To provide a site-specific environmental evaluation, it is necessary that appropriate procedures be used for characterizing the samples. To achieve this, IVL has developed a methodology that incorporates biological assays, chemical analysis and evaluation of the leaching potential of the contaminants. The bioassays are directed to determining the toxicity of the contaminants that are present, their recalcitrance and their bioavailability at the contaminated site. Since contaminants may effect biota differentially, the set of bioassays has been extended to include bacteria, higher plants and worms that represent different levels in the food chain.

A combination of bioassays and chemical analysis has been applied to several contaminated soil samples and to pure chemical compounds. Assays for the effect of contaminants on seed germination and elongation of roots and shoots were carried out using English ryegrass, white clover and radish, and the worm *Enchytraeus crypticus* was used for assays of toxicity and the effect on fecundity. The metabolism of PAHs was examined using soil bacteria. A number of preliminary experiments were carried out on the uptake of contaminants in plants and in worms using both pure chemicals and a contaminated soil sample. The results from the bioassays have been compared with generic guideline values published by the Swedish Environmental Protection Agency.

Key words: contaminated soil, biological assays, higher plants, worms, bacteria, chemical analysis, organic compounds, metals, site-specific impact assessment

1 Inledning

Naturvårdsverket har tagit fram generella riktvärden för olika typer av markanvändning som vägledning vid bedömning av förorenad mark (NV 1996a). NV betonar att dessa värden endast är generella och att platsspecifika värden bör tas fram för varje enskilt område. I praktiken fungerar emellertid NVs riktvärden ofta som gränsvärden med krav på alltför omfattande åtgärder som följd.

Varje område är unikt. Förutsättningarna för en riktig riskbedömning är att ändamålsenliga metoder används för karakterisering av den förorenade marken och att resultatet av denna karakterisering utgör grunden för en platsspecifik bedömning av jordens föroreningsgrad.

En mycket viktig parameter vid riskbedömning och val av saneringsmetod är föroreningarnas biotillgänglighet. När föroreningar åldras blir de ofta allt hårdare bundna till organiska komponenter i marken och därigenom mindre tillgängliga. Risken med den förorenade jorden kan i dessa fall överskattas, eftersom bedömning av jord oftast baseras på uppmätta halter av kända föroreningar i mg/kg TS utan hänsyn till aktuell biotillgänglighet.

I den förorenade jorden kan det också finnas ämnen, som inte upptäcks vid de kemiska analyserna och som står för en betydande del av toxiciteten. Föroreningar kan också tas upp i biota (t ex växter, maskar), anrikas och spridas vidare i näringskedjan. En substans som inte ger något utslag i toxicitetstester kan tas upp och omvandlas i biota och härigenom påverka miljön.

Vid en utförd efterbehandling måste en utvärdering av resultatet ske. Nedgång av kända föroreningar kan oftast enkelt mätas med kemiska analyser, men eventuell bildning av nedbrytningsprodukter (metaboliter) är inte lika lätt att upptäcka. Metaboliterna kan ha helt andra egenskaper än ursprungssubstanserna. De kan t o m vara mer skadliga för miljön än ursprungsföreningarna.

Det är således av största vikt att man vid riskbedömning av förorenad mark och vid val av efterbehandlingsmetod tar hänsyn till persistensen, biotillgängligheten och toxiciteten hos föroreningarna i den aktuella jorden och att bedömningen grundas på värden från relevanta tester och arter. Idag saknas oftast sådana värden när det gäller den ekotoxikologiska bedömningen.

För att bidra till en säkrare riskbedömning har IVL utvecklat ett biologiskt testsystem riktat mot aktuella föroreningars toxicitet, persistens och biotillgänglighet i förorenade markområden. Systemet bygger på naturligt förekommande marklevande organismer som testas under så realistiska förhållanden som möjligt. Testerna är utformade så att de

kan användas som underlag vid en platsspecifik riskbedömning av förorenade mark-områden..

De biologiska testerna utgör tillsammans med kemiska analyser och laktester IVLs testpaket för bedömning av förorenad mark.

2 IVLs testpaket för bedömning av förorenad jord

IVLs testpaket grundas på ett nära samarbete mellan biologi och analytisk kemi. Med de kemiska analyserna identifieras och kvantifieras föroreningarna och deras omvandlingsprodukter. De biologiska testerna påvisar eventuell toxicitet och ger svar på föroreningarnas biotillgänglighet. Paketet omfattar också undersökningar av föroreningarnas persistens och upptagsstudier för att ta reda på om föroreningarna kan tas upp i biota och spridas vidare i näringskedjan.

Laktesterna ger en uppfattning om hur mycket av föroreningarna som kan lakas ut till den omgivande miljön. Beroende på jordens beskaffenhet och speciellt dess lerhalt kan föroreningar frisättas och nå grundvatten, vattendrag och sjöar.

Denna rapport omfattar den biologiska och kemiska delen av testpaketet. Laktesterna behandlas i en separat rapport (Fortkamp m fl 2002).

3 IVLs biologiska testsystem

I Tabell 1 ges en förteckning över de biologiska testerna.

Tabell 1 Förteckning över de biologiska testerna som ingår i IVLs testpaket

Test	Testorganism	Testtid (dygn)
Grobarhet, rot- och skotttillväxt	Engelskt rajgräs	5
	Vitklöver	5
	Rädisa	3
Överlevnad och reproduktionsstörning; mask	<i>Enchytraeus crypticus</i>	35
Toxicitet mot jordbakterier	Naturligt förekommande jordbakterier	ca 7
Omvandling och nedbrytning av organiska föreningar	Naturligt förekommande jordbakterier	#
	Växter	#
Upptag i biota	Maskar	#

Flera veckor / månader beroende på testorganism och substans

3.1 Testorganismer

Föroreningarna kan ha olika effekter på olika organismer i marken. I testpaketet ingår bakterier, växter och dagmaskar för att de representerar flera nivåer i näringskedjan. De testorganismer som används förekommer naturligt i den terrestra miljön och ger därför relevanta svar. Testerna är också så utformades att de så långt som möjligt efterliknar den naturliga miljön.

3.1.1 Jordbakterier

Bakterier förekommer överallt i vår miljö och spelar en central roll vid nedbrytning av både naturligt och främmande organiskt material. Det är därför viktigt att ha med bakteriella tester i ett markbedömningsystem. I de mikrobiella undersökningarna, både vid omvandlings- och toxicitetstesten, används enbart de bakterier som redan finns i de testade jordarna. Inga bakteriestammar från kultursamlingar används.

3.1.2 Markfauna

Dagmaskar har stor betydelse för olika markprocesser såsom nedbrytning, mineralisering, luftning och är därför viktiga komponenter i ett markttestsystem. Dessutom kan föroreningar ackumuleras i maskarna och spridas vidare uppåt i näringskedjan. Vi använder *Enchytraeus crypticus*, en vit, ca 1 cm lång vanligt förekommande dagmaskart för att påvisa effekter av föroreningar på överlevnad och reproduktion.

3.1.3 Växter

Växterna har en given plats i ett riskbedömningsystem genom sin centrala roll i det ekologiska systemet. De förekommer i de flesta miljöer vilket ger dem en stor potential som testorganismer. Testarterna har valts ut tre olika grupper enligt rekommendation i OECDs guidelines (1993):

- Engelskt rajgräs som representerar en vanligt förekommande växt i gräsmattor och på betesmarker.
- Vitklöver som är allmänt förekommande och har kvävefixerande bakterier på rötterna vilket gör den till en viktig kvävekälla för marken.
- Rädisa som är en vanlig köksträdgårdsväxt.

3.2 Testmetoder

3.2.1 Toxicitet mot växter

Testen som avser grobarhet och rot- och skotttillväxt är en utveckling av testmetoden beskriven i ”Utveckling av biologiska metoder för bedömning av förorenad mark” (Malmberg m fl 1998). Grunda, rektangulära plastskålar används som testkärl. Ett tunt lager av testjorden breds ut över skålens botten och genomvattnas med avjoniserat vatten. Vid test av rena substanser blandas dessa direkt i sand (kornstorlek 0,8-1,2 mm) eller tillsätts sanden som en vattenlösning. Samma sand används också som ”späd-medium” när olika koncentrationer av en förorenad jord ska testas. Vid teststart placeras tio frön av testväxten på jordytan, som sedan täcks med en plexiglasplatta för att hålla jord och frön på plats. Skålen täcks med tättslutande lock och ställs mörkt i 25°C under tre dygn (rädisa) eller fem dygn (gräs och klöver) varefter antalet grodda frön räknas och rot- och skottlängd mäts. Varje jord eller testsubstans testas i fem replikat mot vardera testväxt. Som kontroll utförs test på samma sätt som ovan men med testjorden utbytt mot sand.

Signifikansen av effekterna beräknas från de numeriska resultaten genom Student's t-test eller Dunnett's t-test.

3.2.2 Toxicitet mot maskar

Försöken utförs enligt en metod beskriven i ”Utveckling av biologiska metoder för bedömning av förorenad mark” (Malmberg m fl 1998). Testen avser reproduktion hos masken *Enchytraeus crypticus*, mätt i antal lagda äggkokonger och hur många av dessa som helt tömts efter det att äggen kläckts och de unga maskarna krupit ut. Försöken utförs vid 20°C i mörker på agarplattor i vilka testjord, vattenextrakt av testjorden eller lösningar av rena testsubstanser tillsammans med havregryn som föda gjutits in. Jord-extrakten erhålls från BLT-laktesterna (Fortkamp m fl 2002). För att få olika koncentrationer av testjordarna blandas dessa med sand (kornstorlek 0,33 mm). Varje koncentration av jord, jordextrakt eller rena substanserna testas i fyra replikat. Kontrollen utgörs av agarplattor utan ingjutning av jord, jordextrakt eller testsubstans. Fem nyligen köns mogna maskar tillsätts per platta. Var femte dag flyttas maskarna över till nya agarplattor, dödlighet och eventuell annan påverkan noteras och de lagda kokongerna på den gamla plattan räknas. Detta upprepas fyra gånger. Plattorna med kokongerna sparas i 15 dagar efter det att maskarna avlägsnats, varefter antalet helt tömda kokonger noteras.

Signifikansen av effekterna beräknas från de numeriska resultaten genom Student's t-test eller Dunnett's t-test.

3.2.3 Toxicitet mot jordbakterier

En toxicitetstestning av ett lösningsmedelsextrakt av jorden utförs också för att få en uppfattning om giftigheten av jordföroreningarna mot de i jorden befintliga bakterierna. Testen bygger på samma princip som resistensbestämning mot antibiotika och finns beskriven i ”Utveckling av biologiska metoder för bedömning av förorenad mark” (Malmberg m fl 1998). Jord från det förorenade området blandades med steril buffert och skakas varsamt för att få loss bakterierna från jorden. Lämplig mängd av suspensionen stryks sedan på ytan av agarplattor med bomullspinnar för att få en jämn tillväxt på agarytan av jordbakterierna. Filterdiskar (8 mm diameter) impregneras med olika koncentrationer av ett lösningsmedelsextrakt av jorden. Efter att lösningsmedlet avdunstat helt placeras filterdiskarna på agarytan och DMSO (dimetylsulfoxid) tillsätts till diskarna för att öka lösligheten av substanserna. Agarplattorna inkuberas och de tillväxtfria zonerna runt diskarna mäts.

3.2.4 Omvandlingsförsök av PAH med bakterier

En bakterieblandning från en PAH-förorenad jord med förmåga att omvandla bl a fluoranten har tidigare anrikas fram (Allard m fl 2000). En tjock kultur av bakterieblandningen tillsätts till ett flytande mineralmedium som innehåller kväve, fosfor och spårelement i ett antal E-kolvar tillsammans med testsubstanserna. Vid olika tidsintervall tas en hel kolv ur försöket och placeras i frys i väntan på analys för nedgång av substanserna och eventuell metabolitbildning såsom beskrivs i ”Utveckling av biologiska metoder för bedömning av förorenad mark” (Malmberg m fl 1998).

För att kontrollera att eventuell nedgång av substanserna inte härrör från kemisk omvandling hämmas den mikrobiologiska aktiviteten genom tillsats av natriumazid till kolvar som blandats på samma sätt som ovan. Prov från dessa kolvar tas endast vid försöksstart och försöksslut.

3.2.5 Upptag i växter

Som komplement till grobarhetstester med växter har inledande försök med upptag och metabolisering av föroreningar i växter utförts.

Frön av testväxten planterades i den förorenade jorden eller vid test av rena substanser i sand eller oförorenad jord med tillsats av testsubstansen. Frön av testväxterna (fem frön per kruka för gräs och klöver och ett frö per kruka för rädisa) sattes i testjorden. Varje koncentration omfattade 4 replikat (4 krukor). Krukorna placerades i ”odlingskammare” med en ljusregim på 16 timmar ljus och 8 timmar mörker. Ljusstyrkan var 5 000 lux och temperaturen varierade under dygnet mellan 18° C och 22° C. Krukorna vattnades regelbundet med en svag näringslösning (Hoagland's medium spätt 4 gånger) (Hoagland

and Arnon 1950) och med avjoniserat vatten. Efter lämplig tid skördades växterna, jorden tvättades noga bort och de olika delarna (rot och stam/blad) skickades till analys.

Naturligt växande gräs från en kreosotförorenad mark samlades också in. Gräset och den jord det vuxit i analyserades för PAH.

3.2.6 Upptag i maskar

Ett inledande försök med upptag av fluoranten med masken *Enchytraeus crypticus* har utförts. Försöket utfördes på agarplattor där testsubstansen tillsammans med havregryn som föda gjutits in. Som kontroll användes plattor med enbart havregryn. Testplattor med fluoranten i halterna 10 och 100 mg/kg agar tillverkades. 10 maskar tillsattes till fem agarplattor av varje koncentration. Var femte dag plockades alla lagda kokonger bort till färska plattor för kontroll av kläckningsfrekvensen. Efter 20 dygn flyttades samtliga maskar över till färska agarplattor med samma koncentration av testsubstansen. Efter sammanlagt 31 dygn flyttades maskarna till nya agarplattor utan fluoranten men med havregryn där de fick gå 1 dygn för att tömma tarmen på fluoranten. Maskarna plockades därefter från agarplattorna till skruvlocksrör och frystes i väntan på analys.

4 Kemiska analyser

4.1 Växter

De olika växtdelarna vägdes in i en bägare och delades i mindre delar med hjälp av sax eller kniv. Provet finfördelades därefter med en "Tissue homogenizer" och extraherades två gånger med aceton och en gång med *n*-hexan. Extrakten slogs ihop och acetonet tvättades bort genom att skaka extraktet med vatten. Hexanfasen torkades sedan över natriumsulfat och koncentrerades. Extraktet kromatograferades före GC-analys på kiselgelkolonn och eluerades med *n*-hexan.

4.2 Jord

En mängd olika faktorer, bl a lösningsmedel, extraktionstid och temperatur, undersöktes för att få fram en optimal analysmetod för förorenad jord. Nedanstående metod ansågs lämpligast och användes vid upparbetningen av jordproverna.

Jordprov spikades med utbytesstandard, blandades väl och extraherades med aceton och *n*-hexan i 17 tim. Provet centrifugerades och organfasen togs tillvara. Kaliumhydroxid tillsattes till pelleten (jordprovet) för att höja pH till över 12. Efter tillsatts av cyklohexan och metanol extraherades provet först i ultraljud och därefter vid 95°C.

Lösningsmedelsfasen drogs av och sparades. En sista extraktion utfördes med en aceton / pentan blandning. De tre lösningsmedelsfaserna slogs ihop, skakades med vatten för att tvätta bort metanol och aceton. Det erhållna extraktet kromatograferades före GC-analys på kiselgelkolonn och eluerades med *n*-hexan.

4.3 Maskar

Prov togs ut från det agarmedium som maskarna odlats på och spikades med utbytesstandard. Pyrofosfat och vatten tillsattes. Provet värmdes till 60°C för att smälta agarmediet. Efter avkylning extraherades provet med cyklohexan tre gånger. Extrakten slogs samman och analyserades utan föregående rening.

Maskprov spikades med utbytesstandard och en kaliumhydroxidlösning (1M) tillsattes. Provet behandlades i ultraljudbad och värmdes på värmeblock tills maskvävnaden fullständigt lösts upp. På grund av emulsionsproblem surgjordes provet före extraktion. Provet extraherades två gånger med cyklohexan. Det hopslagna extraktet skakades med vatten och renades genom kromatografering på kolonn med aluminiumoxid och eluerades med bensen.

4.4 Omvandlingsförsök med bakterier

Proven centrifugerades för att separera vattenfas (odlingsmediet) och bakterieceller. Cellerna spikades med utbytesstandard och extraherades med acetonitril i ultraljudbad och på skakbord. Proven centrifugerades och acetonitrilen drogs av. Extraktionen upprepades ytterligare en gång och extrakten slogs samman. Odlingsmediet surgjordes och extraherades med hjälp av fast-fas-kolonn (C18). Föreningarna eluerades från kolonnen med acetonitril. Extrakten från cellerna och mediet slogs samman för analys på HPLC.

4.5 Derivatiseringar

För att påvisa karboxylsyror i nedbrytningsförsöken derivatiserades extrakten med HCl / metanol. Genom denna derivatisering bildas motsvarande metylestrar vilka är lämpliga för analys på både GC och HPLC.

Acetylering användes på samma vis för att påvisa fenolära metaboliter i proven. Vid acetyleringen användes ättiksyraanhydrid som reagens och pyridin eller natriumacetat som bas.

I en del fall användes även reagenset *N*-metyl-trimetylsilyltrifluoroacetimid (MSTFA) för att derivatisera både syror och fenoler samtidigt. Derivatet som bildas lämpar sig enbart för GC-analys. Detta reagens reagerar även med alkoholer.

4.6 Instrument

4.6.1 Gaskromatografi

Analyserna utfördes på en HP 5890 II utrustad med FID-detektor och en DB-5 kolonn (30 meter, innerdiameter 0,32 mm, 0,25 µm fas). Helium användes som bärgas. Följande temperaturprogram användes: Isotermt i 2 min vid 60°C, därefter höjdes temperaturen med 25°C/min till 120°C som hölls i 2min, därefter höjdes temperaturen med 5°C / min till 300°C som hölls i 13 min.

4.6.2 HPLC

Proverna kromatograferades på en C18-kolonn (250 mm, 4 mm ID, 5µ partiklar). Flödet var 1 ml/min och analyterna detekterades med UV-detektion vid 254 nm. Följande gradient användes: 15% acetonitril vid start följt av en gradient till 20% acetonitril efter 2 min, därefter en gradient till 100% acetonitril efter 20 min som hölls isokratiskt i 10 min.

5 Mätosäkerhet

Begreppet mätosäkerhet har varit känt av kemister under lång tid. Trots detta har mätosäkerhet hittills inte bestämts på ett enhetligt sätt utan beräkningen av den varierar mellan olika laboratorier. Det var först efter publiceringen av "Guide to expression of uncertainty in measurement" (BIMP m fl 1993) som formella regler för utvärdering av mätosäkerhet för olika kemiska metoder fick en större spridning. I dag är det ett krav för ackrediterade analyser att osäkerheten skall anges utifrån dessa kriterier.

Det är viktigt att ange mätosäkerheten för analytiska resultat då dessa ofta utgör underlag för viktiga beslut i samhället. I annat fall kan mätresultat lätt tolkas som absoluta värden vilket aldrig kan vara fallet.

Mätosäkerhet utgör summan av osäkerhetsfaktorer i samband med provhantering från själva provtagningen fram till och med den kemiska analysen, såsom matriseffekter, interferens, osäkerhet i volumetrisk och gravimetrisk utrustning. För att utvärdera mätosäkerheten analyseras ett eller flera kontrollprov vid varje analystillfälle. Analysresultaten behandlas statistisk för att bestämma mätosäkerheten. Tre olika typer av kontrollprov förekommer. Det kanske vanligaste och enklaste är en kontrollösning innehållande analyterna. Närmare verkliga prov kommer man om spikade prov eller certifierade referensprov används.

Mätosäkerheten som erhålls med kontrollösningar ligger mellan 2-5%. Den utvidgade mätosäkerheten som tar hänsyn till alla felkällor i analysen ligger vanligen mellan 15-

25%. I denna beräkning ingår en säkerhetsfaktor på två. Eftersom vi inte kan bestämma halterna med större säkerhet än vad mätosäkerheten anger, är det självklart att ett riktvärde inte kan uppfattas som exakt. Om riktvärdet är 40 mg/kg och mätosäkerheten 25% skall detta värde ses som ett intervall, 40 ± 10 d.v.s. 30-50 mg/kg.

Riktvärdena i sig baserar sig på ett stort antal empiriska data innehållande en viss mätosäkerhet. Osäkerheterna summeras under processen som utmynnar i riktvärdena. Mätosäkerheten i analyserna i dag är relativt väl kända men osäkerheten i de riktvärden som används i dag har inte beräknats. Konsekvensen av detta blir att det inte går att fastställa när ett provresultat statistiskt är skilt från riktvärdet.

6 Testmaterial

IVLs testpaket prövades på ett antal jordar förorenade med både organiska föreningar och metaller. Rena substanser testades också. Resultaten från testerna jämfördes med Naturvårdsverkets riktvärden (1996a).

Resultaten från de biologiska testerna med både organiska och oorganiska föroreningar presenteras nedan.

6.1 Testade jordar

- Referensjordar: Jordprover från Ekbacken vid Sickla Udde, Observatoriekullen och Gärdet.
- Kreosotförorenad jord.
- Jord förorenad med arsenik, krom, koppar.
- Jordar spikade med två olika halter av skärvätska.

6.2 Rena substanser

Karbazol, fluoranten, pyren och xylenol.

7 Resultat

7.1 Referensjordar

Tre jordprov från olika områden i Stockholm där jorden anses som oförorenad testades. Proverna togs från Observatoriekullen, Gärdet och Ekbacken vid Sickla Udde på mellan 0,2 och 1 m djup. Eftersom enbart enskilda prov togs, behöver värdena inte vara repre-

sentativa för hela området, men bör kunna ge en uppfattning om bakgrundshalter i marken i stadsmiljö.

Jordarna analyserades för flera olika metaller, PAH och för BTEX (bensen, toluen, etylbensen, xylen). Halterna av BTEX var under detektionsgränsen (0,1mg/kg för bensen och 0,01mg/kg för de övriga). De analyserade halterna av metallerna och de PAH som ingår i Naturvårdsverkets riktvärdeslista (1996a) redovisas nedan i Tabell 2-4. NVs riktvärden för känslig markanvändning (KM) finns också angivna i tabellerna.

Tabell 2. Metallhalter i referensjordar, värden i mg/kg TS

	Cr	Ni	Cu	Zn	Pb	Cd	Hg	As
Gärdet	45	21	25	70	19	<0,4	0,031	2,3
Observatoriekullen	62	42	67	160	82	0,5	0,44	3,9
Ekbacken	22	11	42	54	46	<0,4	0,12	2,22
Riktvärde KM	120	35	100	350	80	0,4	1	15

Tabell 3. Halter av icke cancerogena PAH i referensjordarna, värdena angivna i µg/kg TS

Prov	Ekbacken	Observatoriekullen	Gärdet
Förening			
Naftalen	2.5	2.4	4.2
Acenaftalen	<#	<	1.8
Acenaften	1.9	4.0	5.5
Fluoren	1.9	4.0	10
Fenantren	32	14	171
Antracen	2.5	0.8	33
Fluoranten	75	15	240
Pyren	56	11	471
Benso[ghi]perylen	29	6.4	96
Summa	192	40	1011

Riktvärde KM 20 000 Ekotoxikologiskt riktvärde KM 20 000

Detektionsgräns: 1 µg/kg TS

Tabell 4. Halter av cancerogena PAH i referensjordarna, värdena angivna i µg/kg TS

Prov Förening	Ekbacken	Observatoriekullen	Gärdet
Benso[a]antracen	26	6	67
Chrysen	56	10	189
Benso[b]fluoranten	61	6	157
Benso[k]fluoranten	34	<#	114
Benso[a]pyren	31	7	122
Indeno[1,2,3-cd]pyren	39	7	90
Dibens[ah]antracen	9	1	19
Summa	247	47	758

Riktvärde KM 300 Ekotoxikologiskt riktvärde KM 20 000

Detektionsgräns: 1 µg/kg TS

Jordproverna testades för rot- och skotttillväxt med engelskt rajgräs och vitklöver och dessutom testades vattenextrakt av jordarna med mask.

Två av jordarna gav utslag i testerna. Jorden från Observatoriekullen gav en svag negativ effekt på rottillväxten hos vitklöver och vattenextraktet av jorden från Ekbacken påverkade antalet lagda kokonger hos masken *Enchytraeus crypticus*.

Ingen av de testade jordarna innehöll metallhalter som överskred de ekotoxikologiska riktvärdena (KM). Provet från Observatoriekullen innehöll halter av nickel, bly och kadmium i samma storleksordning som de humantoxikologiska riktvärdena (KM). I jordprovet från Gärdet överskreds det humantoxikologiska riktvärdet (KM) för cancerogena PAH men halterna låg under det ekotoxikologiska riktvärdet. Ingen av testerna gav något utslag på jorden från Gärdet.

Utslagen på testerna kan inte förklaras av de analyserade halterna av enskilda metaller eller PAH. Föroreningar, som inte analyserats, svarar sannolikt för den toxiska effekten.

7.2 Kreosotförorenad jord

Kreosotförorenad jord samlades in från kvarteret Lyftkranen (ett förorenat industriområde i Ulvsunda, Stockholm). Tre olika prover togs, två från själva området (prov 844 och 845) och ett kontrollprov utanför området (prov 847). Två jordprov från ett impregneringsverk togs också (prov 31 och 32). Proverna analyserades avseende PAH-innehåll och resultaten redovisas i Tabell 5. Totalt analyserades 24 olika substanser. I tabellen anges totalsumman PAH samt summan cancerogena PAH och summan övriga PAH enligt Naturvårdsverkets riktvärdeslista (1996a).

Analysresultaten visar att sammansättningen av de olika substanserna skiljer sig mellan de olika proverna, även mellan dem som är tagna från samma område. I prov 844 återfanns högre halter av substanser med få ringar (2-3) än i jord 845. Totalsummorna skiljer sig inte mycket åt men summan av de cancerogena PAHerna är mycket högre i jord 845. Även i kontrolljorden med en mycket låg total PAH-halt överskreds riktvärdet för cancerogena PAHer. Denna jord skulle alltså inte godkännas enligt riktvärdeslistan.

De två jordarna från impregneringsverket varierade mycket i PAH-halter. Jord 31 innehöll mycket låga halter och PAHer med många ringar (fyra och fler) dominerade. Riktvärdet för cancerogena PAHer överskreds i denna jord trots den låga totalhalten. Jord 32 innehöll extremt höga PAH-halter men i denna jord dominerade de med få ringar (fyra ringar och färre). I jord 31 fanns endast de svårnedbrytbara PAHerna kvar medan även de mer lättnedbrytbara med få ringar kunde återfinnas i jord 32.

Tabell 5. Analyserade PAH halter (mg/kg TS)

Jord	844	845	847	31	32
Substans					
Naftalen*	52	6	<#	<	2
2-metylnaftalen	31	2	<	<	31
1-metylnaftalen	17	1	<	<	78
Bifenyl	6	<	<	<	12
2,6-Dimetylnaftalen	8	2	<	<	106
Acenaftalen*	6	<	<	<	23
Acenaften*	31	7	<	<	1830
2,3,5-Trimetylnaftalen	3	1	<	<	40
Fluoren*	50	2	<	<	1990
Fenantren*	130	51	1	0,3	5350
Antracen*	47	17	<	0,1	1090
1-Metylfenantren	6	5	<	0,03	220
Fluoranten*	71	94	1	2	3830
Pyren*	45	76	1	1	1770
Benso[<i>a</i>]antracen**	20	41	<	0,4	100
Chrysen**	25	43	1	2	205
Benso[<i>b</i>]fluoranten**	16	40	1	0,7	66
Benso[<i>k</i>]fluoranten**	13	30	1	0,2	44
Benso[<i>e</i>]pyren	11	29	1	0,5	38
Benso[<i>a</i>]pyren**	16	42	1	0,5	34
Perylen	6	16	<	0,1	11
Indeno[<i>1,2,3-cd</i>]pyren**	10	26	1	1	10
Dibens[<i>ah</i>]antracen**	4	7	<	0,1	6
Benso[<i>ghi</i>]perylene*	9	23	1	0,4	12
Totalsumma	630	560	10	9	17000
Summa övriga PAH	440*	280*	4*	4*	16000
Summa cancerogena PAH	100**	230**	5**	5**	470

Riktvärde KM Summa övriga PAH 20 Riktvärde KM cancerogena PAH 0,3

*De substanser som anges som "summa övriga PAH" enligt Riktvärdeslistan

** De substanser som anges som "Summa cancerogena PAH" enligt Riktvärdeslistan

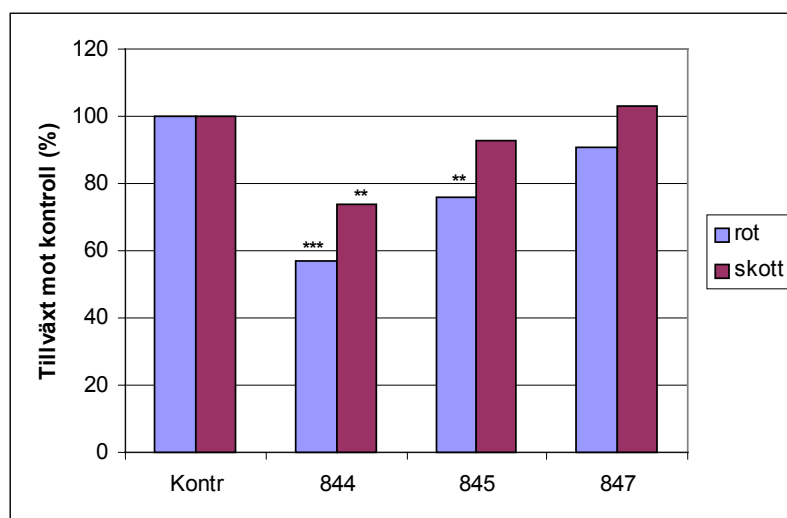
< Detektionsgräns: 0,001 mg/kg TS

7.2.1 Biologiska tester

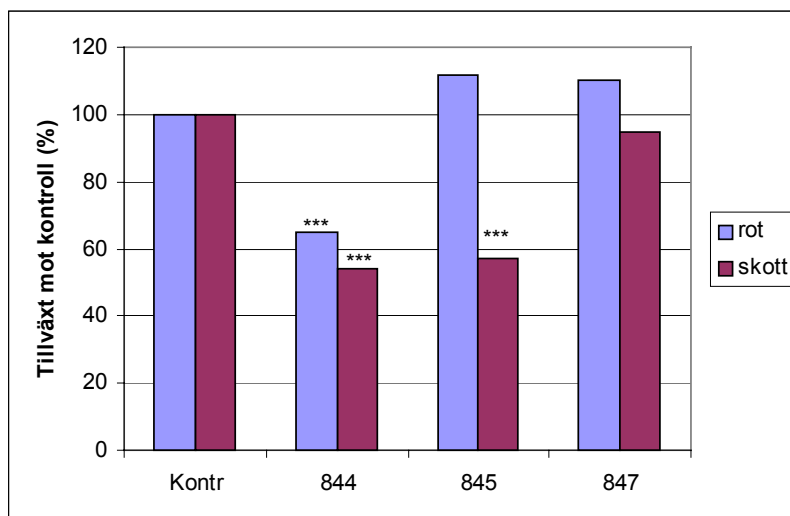
7.2.1.1 Växter

Jord 844, 845 och 847 testades mot gräs och vitklöver avseende och rot- och skotttillväxt. Jord 844 testades också avseende grobarhet mot engelskt rajgräs och vitklöver. De två jordarna från impregneringsverket (31 och 32) testades bägge för grobarhet och rot- och skotttillväxt mot gräs, vitklöver och rädisa.

Både rot- och skotttillväxten hos vitklöver och engelskt rajgräs påverkades kraftigt av jord 844. Jord 845 gav en något mindre påverkan, dock kunde tydliga effekter ses på rottillväxten hos engelskt rajgräs och skotttillväxten hos vitklöver (Figur 1 och Figur 2). Antalet grodda frön av vitklöver påverkades också starkt av jord 844. Grobarheten hos engelskt rajgräs påverkades inte alls. Att jord 844 gav en så mycket kraftigare påverkan än jord 845 beror antagligen på att den innehöll en stor mängd substanser med få ringar (2-3). Dessa substanser är mer vattenlösliga och därmed mer tillgängliga.

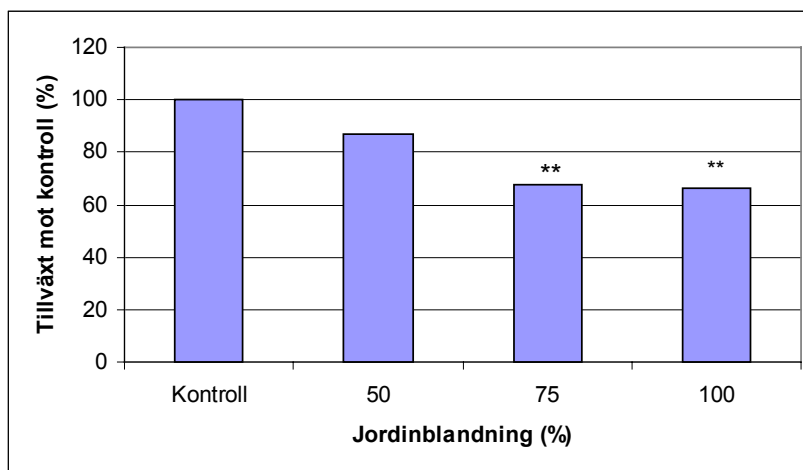


Figur 1. Resultat från rot- och skotttillväxt med engelskt rajgräs exponerat för kreosotförorenad jord från kvarteret Lyftkranen. ** $P < 0,05$; *** $P < 0,001$



Figur 2. Resultat från rot- och skotttillväxt med vitklöver exponerad för kreosotförorenad jord från kvarteret Lyftkranen. *** $P < 0,001$

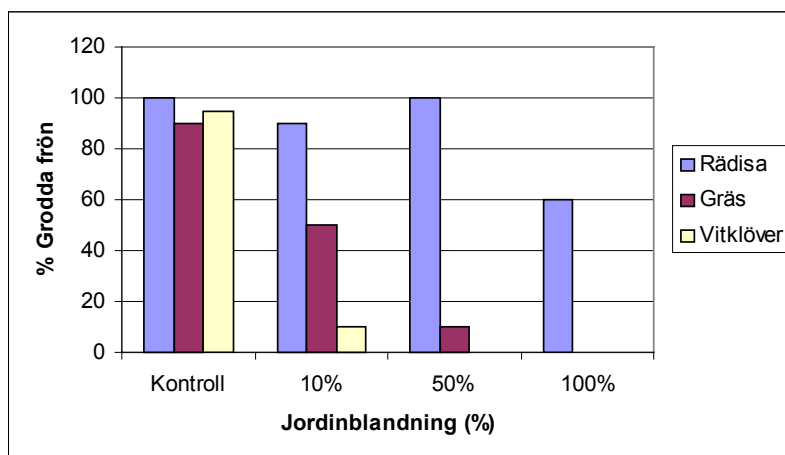
Ingen påverkan av jord 31 kunde påvisas med klöver eller rädisa. En signifikant negativ effekt på rottillväxten kunde dock visas med engelskt rajgräs vid 75% och 100% jordinblandning (Figur 3). Analysresultaten visar på mycket låga halter av PAH som inte kan förklara tillväxthämningen. Föroreningar, som inte analyserats, står antagligen för den toxiska påverkan. Resultaten visar också att olika växtarter reagerar olika mot olika föroreningar och att det därför är viktigt att inte bara använda en art vid testning.



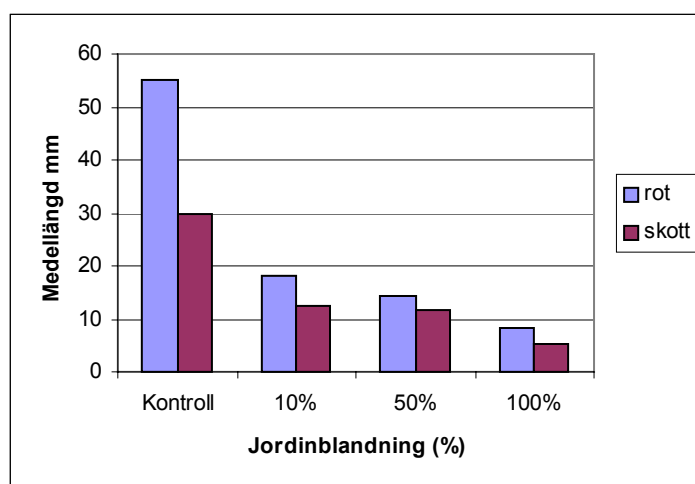
Figur 3. Rottillväxt mot kontroll hos engelskt rajgräs exponerat för kreosotförorenad jord från ett impregneringsverk (jord 31). ** $P < 0,05$

Jord 32 innehöll mycket höga PAH-halter. Grobarheten hos vitklöver och engelskt rajgräs påverkades redan vid 10% jordinblandning (lägsta testade koncentration). Däremot

påverkades inte grobarheten hos rädisa förrän vid 100% jordinblandning (Figur 4). Både rot- och skottillväxten hos rädisa påverkades dock redan vid 10 % inblandning. (Figur 5). Resultaten visar att rädisa är betydligt tåligare mot PAH-föroreningar än både gräs och vitklöver.



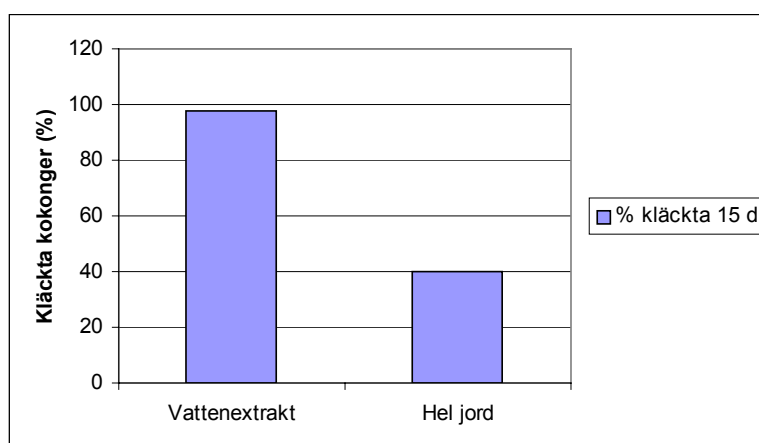
Figur 4. Resultat från grobarhetstest med starkt kreosotförorenad jord från ett impregneringsverk (jord 32).



Figur 5. Påverkan på rot- och skottillväxten hos rädisa efter exponering mot starkt kreosotförorenad jord (jord 32).

7.2.1.2 Maskar

Vattenextrakt av jordarna från kvarteret Lyftkranen testades avseende toxicitet och reproduktion mot masken *Enchytraeus crypticus*. Ett begränsat test med jord 844 med färre antal maskar och kortare exponeringstid och hel jord istället för vattenextrakt utfördes också. Testet med vattenextrakt gav ingen effekt för någon av jordarna på *E. crypticus*. Vid den begränsade testen med hel jord (jord 844) påverkades kläckningen kraftigt. Endast 40% av de lagda kokongerna kläcktes mot normalt 90-100% (Figur 6). Dödligheten eller kokongantalet påverkades däremot inte. Skillnaden mellan resultaten från testerna med jord respektive vattenextrakt beror med största säkerhet på att de flesta PAHer har dålig vattenlöslighet och binds hårt till jordpartiklarna. De sitter därför kvar i jorden och kan inte extraheras ut med vatten. I den hela jorden är de däremot tillgängliga för maskarna. Resultaten från de båda testerna visar faran med att testa vattenextrakt från förorenade jordar och att det är viktigt att sträva efter testmetoder och testförhållanden som liknar den naturliga miljön i så stor utsträckning som möjligt.



Figur 6. Jämförelse av resultat från test med *E. crypticus* exponerade för vattenextrakt av jord och hel jord ingjuten i agarplattor (jord 844).

7.3 Arsenik- krom- kopparförorenad jord

Jordprover innehållande krom, koppar och arsenik från ett impregneringsverk undersöktes (provnummer 11-14). Tester med gräs, vitklöver och rädisa (grobarhet och rot- och skotttillväxt) utfördes på fyra jordar med olika föroreningsgrad. Dessutom testades vattenextrakt från de olika jordarna mot mask. Halterna av de olika föroreningarna visas i Tabell 6. Ytterligare ett försök utfördes med den mest förorenade jorden i vilket den späddes med sand och testades mot växterna i olika koncentrationer.

Tabell 6. Analyserade halter av As, Cr och Cu i olika jordar från ett impregneringsverk (mg/kg TS).

Substans	Arsenik	Krom	Koppar
Jord			
11	2,0	25	20
12	47	58	41
13	2,9	26	20
14	605	300	710
Riktvärde (KM)	15	120	100

Halterna av krom och koppar överskred NVs riktvärden i jord 14 och arsenikhalten överskreds i jord 12 och 14. Arseniken analyserades dock som totalarsenik och förekomstformen i de olika jordarna är inte känd. De olika förekomstformerna kan ha mycket olika toxisk påverkan på organismer (Carbonell-Barrachina m fl 1999).

7.3.1 Resultat från tester med hela jordar

Samtliga växter uppvisade en signifikant effekt mot jord 14 (den mest förorenade). Jord 11 gav dessutom en svag effekt på rottillväxten hos engelskt rajgräs. Denna effekt beror antagligen på okända föroreningar i jorden då de analyserade halterna av As, Cr och Cu var mycket låga.

Ingen av de testade jordarna gav någon effekt på överlevnad eller antal lagda kokonger hos *E. crypticus*. Jord 13 påverkade dock kläckningsfrekvensen av kokongerna negativt. Inte heller denna effekt kan förklaras av de analyserade halterna av As, Cr och Cu.

7.3.2 Resultat från tester med spädd jord

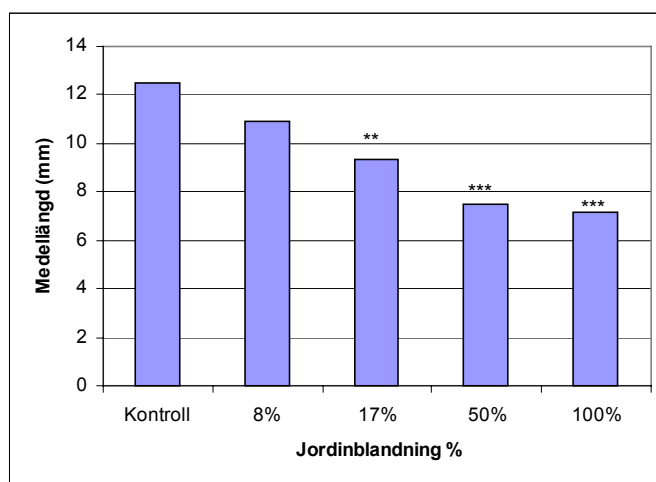
För att kunna testa olika halter av föroreningarna gjordes en spädningsserie av den mest förorenade jorden (jord 14) med sand. De olika spädningarna och halterna av As, Cr och Cu visas i Tabell 7.

Tabell 7. Testade halter av As, Cr och Cu i jord 14 efter spädning med sand (mg/kg TS).

Substans	Arsenik	Krom	Koppar
Spädning (% jordinblandning)			
8%	50	25	60
17%	100	50	120
50%	300	150	355
100%	605	300	710
Riktvärde (KM)	15	120	100

Ingen eller mycket liten påverkan kunde uppmätas på skottillväxten hos de tre testväxterna även vid den högsta koncentrationen (ospädd jord). Rottillväxten hos rädisa

och engelskt rajgräs påverkades endast av den ospädda jorden. Signifikant påverkan på rottillväxten hos vitklöver kunde däremot påvisas redan vid 17% jordinblandning (Figur 7). Arsenik- och kopparhalterna ligger där över riktvärdet. Testerna med den spädda jorden visar att växterna är olika känsliga och att i detta fall vitklöver är den mest känsliga av de tre testade arterna.



Figur 7. Påverkan på rotlängden av vitklöver exponerad för en spädningsserie av en jord förorenad med As, Cr och Cu (jord 14). ** $P < 0,005$.

7.4 Jord spikad med skärvätska

Jord spikad med två olika halter av en skärvätska testades mot växter och mask. Halterna av skärvätskan angavs som 0, 5% (jord 27) och 0,05% (jord 28) oljeinnehåll i jorden. Skärvätskan innehåller en rad olika substanser, av vilka en organisk borförening misstänktes vara den mest toxiska. Trots att bor i mycket låga koncentrationer är ett nödvändigt spårelement för växter är det giftigt i höga koncentrationer (Bingham 1973). Totalhalten bor analyserades därför. Halten bor i jord 27 var 162 mg/kg TS.

7.4.1 Resultat växttester

Jordarna testades ospädda för grobarhet och rot- och skotttillväxt hos engelskt rajgräs, vitklöver och rädisa. Inga frön från någon av växterna kunde gro och tillväxa i de två jordarna, vilket visar på mycket hög toxicitet.

7.4.2 Resultat masktester

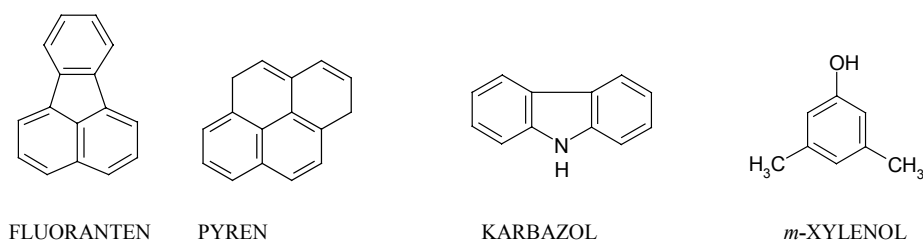
En begränsad masktest med endast två replikat utfördes på de två jordarna. Jordarna testades endast i en koncentration (15 g jord / petriskål med 5 maskar). Samtliga maskar

överlevde hela testperioden men antalet lagda och för jord 27 även antalet kläckta kokonger påverkades kraftigt. Detta visar att tester där endast överlevnaden mäts kan grovt underskatta en jords påverkan på organismerna. Effekter på reproduktionen är lika allvarliga som rent dödliga effekter.

7.5 Rena substanser

7.5.1 Grobarhet och rot- och skotttillväxt

Fyra rena substanser, pyren, fluoranten, karbazol och xylenol (Figur 8), som förekommer i relativt höga halter i kresot (Meuller m fl 1989, Meyer m fl 1999) och kan förväntas återfinnas i förorenad jord, testades mot växterna. Pyren och fluoranten ingår i NVs riktvärdeslista i gruppen ”övriga PAH”. Däremot finns inget riktvärde för karbazol som är en heterocyklisk kväveförening eller för xylenol som är en alkylerad fenol.



Figur 8. Strukturformler för använda testsubstanser.

Karbazol, pyren och fluoranten blandades med sand och testades för grobarhet och rot- och skotttillväxt i endast en koncentration. Det har visats att påverkan på tidiga utvecklingsstadier hos växter av PAHer med fyra ringar och mer i allmänhet är låg (Malmberg m fl 1998, Maliszewska-Kordybach och Smreczak 2000). En mycket hög koncentration (1500 mg/kg sand) användes därför för att få utslag i testerna. Resultaten från rot- och skotttillväxten redovisas i Tabell 8. Ingen påverkan på grobarheten kunde konstateras hos någon av växterna.

De tre testväxterna reagerade olika på de tre substanserna. Rädisan gav inget utslag för någon av substanserna trots den höga testkoncentrationen. Hos engelskt rajgräs påverkades rottillväxten men inte skotttillväxten av fluoranten och pyren. Vitklöver däremot gav utslag för skotttillväxten av alla tre substanserna. Observationen att rottillväxten hos engelskt rajgräs och skotttillväxten hos vitklöver påverkas av dessa substanser stämmer med resultaten från testerna av den kresotförorenade jorden från kvarteret Lyftkranen. Försöken bekräftar att olika växter reagerar olika och att både rot- och skotttillväxten måste mätas för att få ett säkrare svar på toxiciteten.

Tabell 8. Påverkan på rot- och skotttillväxten hos testväxterna av tre rena substanser. Testkoncentration: 1500 mg/kg sand. Riktvärdet för ”övriga PAH” (KM) enligt NVs lista är 20 mg/kg jord

Substans		Fluoranten	Pyren	Karbazol
Växt				
Engelskt rajgräs	rot	*	**	-
	skott	-	-	-
Vitklöver	rot	-	-	-
	skott	**	**	**
Rädisa	rot	-	-	-
	skott	-	-	-

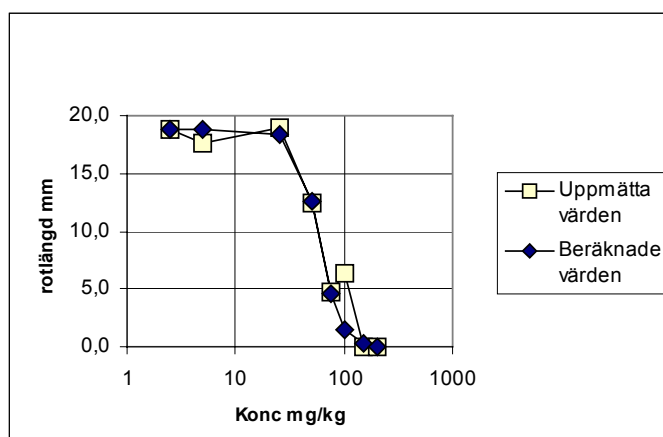
– ingen signifikant påverkan; * signifikant påverkan P <0,05; ** signifikant påverkan P <0,01

Den fenolära föreningen xylenol testades i minst fem olika koncentrationer för beräkning av EC₅₀ värden (den koncentration där 50% påverkan sker). Resultaten redovisas i Tabell 9. EC₅₀ värdena bestämdes från en teoretiskt uträknad kurva enligt formeln:

$$\text{tillväxt}_{\text{calc}} = \text{tillväxt}_{\text{min}} + (\text{tillväxt}_{\text{max}} - \text{tillväxt}_{\text{min}}) * (\text{konc}_i / \text{EC}_i)^{\text{slope}} / (1 + (\text{konc}_i / \text{EC}_i)^{\text{slope}})$$

tillväxt_{min} = tillväxt vid lägsta koncentration; tillväxt_{max} = tillväxt vid högsta koncentrationen; i = det EC värde som ska beräknas; slope = lutningen av dos-responskurvan.

Figur 9 visar de erhållna värdena i försöket med rädisa samt den teoretiskt uträknade kurvan.



Figur 9. Kurva för beräkning av EC₅₀ värde för skotttillväxten hos rädisa exponerad för xylenol tillsammans med kurva med uppmätta värden från försöket.

Tabell 9. EC₅₀ värden för rot- och skotttillväxt med xylenol (mg/kg jord)

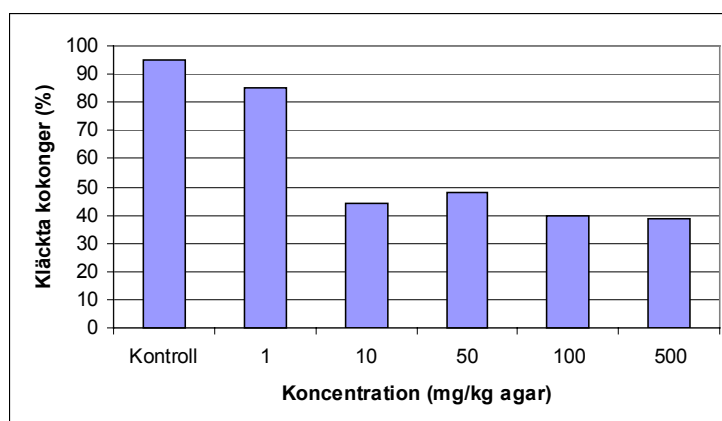
	Vitklöver	Engelskt rajgräs	Rädisa
Skotttillväxt	4	21	58
Rotttillväxt	4	20	48

Riktvärde KM: 4 mg/kg jord. Då inget riktvärde finns för xylenol har värdet för fenol + kresol angivits.

Testresultaten visar att xylenol är relativt toxisk mot växter och att de tre testväxterna reagerar olika. Resultaten visar också att utformningen av växttesterna väl lämpar sig för att beräkning EC_x värden och inte bara för att ange om signifikant effekt av en jord eller substans finns.

7.5.2 Masktest

E. crypticus testades för överlevnad och reproduktionsstörningar mot karbazol. Flera olika koncentrationer testades. Det konstaterades att överlevnaden inte påverkades och inte heller antalet lagda kokonger ens vid den högsta koncentrationen. Däremot observerades en försämrad kläckningsfrekvens redan vid låga koncentrationer (Figur 10). Något dos-responsförhållande kunde dock inte påvisas. Detta kan bero på att substansen har låg vattenlöslighet och att det är endast den lösta fraktionen som står för den negativa påverkan på reproduktionen. Resultaten visar också att kläckningen är en känslig parameter och att toxiciteten lätt kan underskattas om endast överlevnaden studeras i masktesterna.



Figur 10. Resultat av kläckningsfrekvensen av kokongerna från test med karbazol och *E. crypticus*.

7.6 Omvandlingsförsök med pyren och fluoranten

Ofta analyseras bara nedgången av en substans efter t ex en sanering eller i en åldrad förorenad jord. Många föreningar bryts emellertid inte ned utan förändras bara och

omvandlingsprodukter (metaboliter) bildas. Dessa metaboliter kan ha helt andra egenskaper än ursprungssubstanserna och ha negativa effekter på miljön. De bildade metaboliterna kan vara mer vattenlösliga och risken för spridning i marken ökar då. Även tillgängligheten för biota kan öka.

Ett laboratorieförsök med pyren och fluoranten utfördes där inte bara nedgången av substanserna utan också bildningen av metaboliter undersöktes. En bakterieblandning med känd förmåga att omvandla fluoranten användes (Allard m fl 2000). Bakterieblandningen odlades upp och koncentrerades genom centrifugering. Kolvar med kända mängder pyren eller fluoranten och ett flytande medium innehållande spårelement och vitaminer ympades med bakterierna. Vid bestämda tidsintervall togs prov från kolvarna och analyserades avseende nedgång av ursprungssubstanserna och förekomsten av eventuella metaboliter.

Omvandlingen av fluoranten visade ingen eller en mycket kort lagfas innan en minskning i halten kunde konstateras. Vid försöken med pyren iaktogs en tydlig lagfas på ca. 12 dygn. Omvandlingen skedde därefter med ungefär samma hastighet för de två föreningarna.

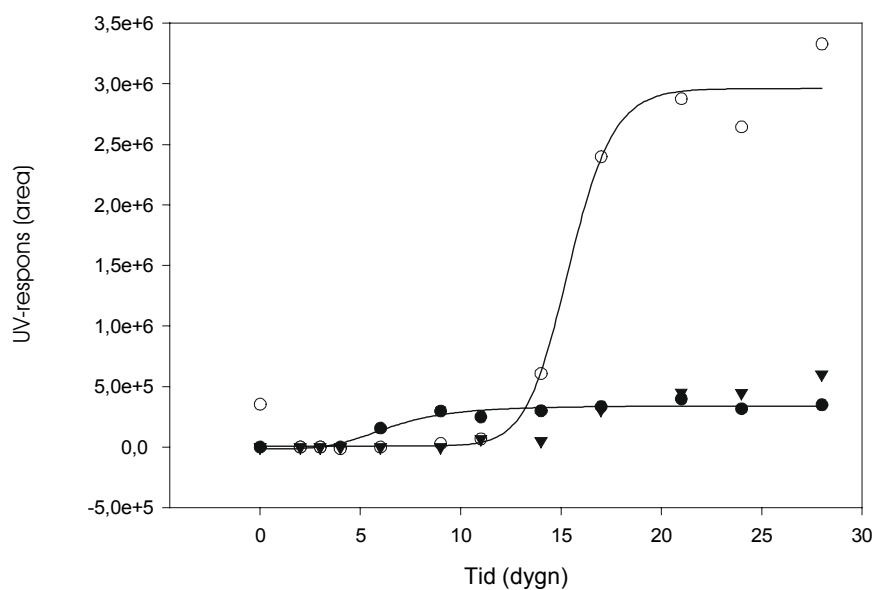
7.6.1 Pyren

Efter lagfasen omvandlas pyren med en konstant hastighet. Halten metaboliter når efter 10-20 dygn, beroende på metabolit, en platófas. Halten pyren fortsätter dock att avta linjärt. Detta kan tolkas som att bildningen av metaboliter står i jämvikt med den fortsatta omvandlingen av dessa, och att metaboliterna inte har någon hämmande effekt på omvandlingen.

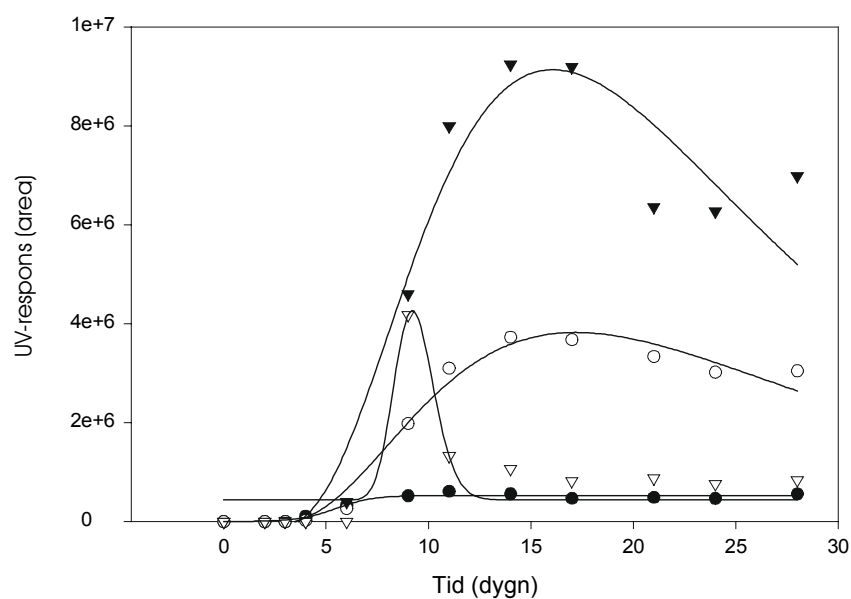
De olika derivatiseringarna visade att olika karboxylsyror bildades vilket betyder att spjälkning av en eller flera ringar har skett. Inga fenolära föreningar kunde påvisas. Vid fraktioneringen i neutrala och sura metaboliter återfanns två i det neutrala extraktet och tre i det sura (Figur 11).

7.6.2 Fluoranten

Eftersom ett stort antal metaboliter påvisades från fluoranten behandlas här bara huvudkomponenterna. Efter fraktionering i sura och neutrala metaboliter återfanns i den sura minst nio föreningar varav tre dominerade (Figur 12). Fraktioner med neutrala föreningar innehöll två komponenter. Två av metaboliterna var troligen instabila i basisk miljö eftersom de inte kunde återfinnas efter fraktioneringen. Förmodligen är de laktoner vilka bildas vid ringspjälkning. Detta sker t ex vid omvandling av antracen (Moody m fl 2001).



Figur 11. Bildade metaboliter från försöket med bakteriell omvandling av pyren. Detektionen gjordes vid 254 nm.



Figur 12. Bildade metaboliter från försöket med bakteriell omvandling av fluoranten. Detektionen gjordes vid 254 nm.

Metaboliterna innehöll både karboxy- och hydroxygrupper. En eller två föreningar kunde reduceras med dithionit vilket har tolkats som att föreningarna innehåller kinon-strukturer.

Samtliga metaboliter bildade från fluoranten och pyren som påvisades i denna undersökning var mer polära jämfört med moderföreningarna. Detta medför en ökad vattenlöslighet och därmed rörlighet i marksystemet. Som en konsekvens av detta ökar möjligheten för upptag i växter och därmed exponering uppåt i näringskedjan. Den ökade rörligheten utgör också ett hot mot grundvatten.

7.7 Upptag i växter

Substanser kan tas upp i biota (t ex växter, maskar), eventuellt omvandlas, anrikas och på så sätt spridas vidare i näringskedjan. En substans som inte ger något utslag i toxicitetstester kan tas upp och omvandlas i växter och härigenom påverka miljön. För att belysa detta utfördes upptagsförsök med engelskt rajgräs och rädisa. Som testsubstanser användes pyren och fluoranten i koncentrationerna 10, 100 och 1000 mg/kg jord. En ren jord spikades med de olika substanserna. Frön såddes i jorden och fick tillväxa. Efter lämplig tid skördades växterna och de olika växtdelarna finfördelades och analyserades för testsubstanserna.

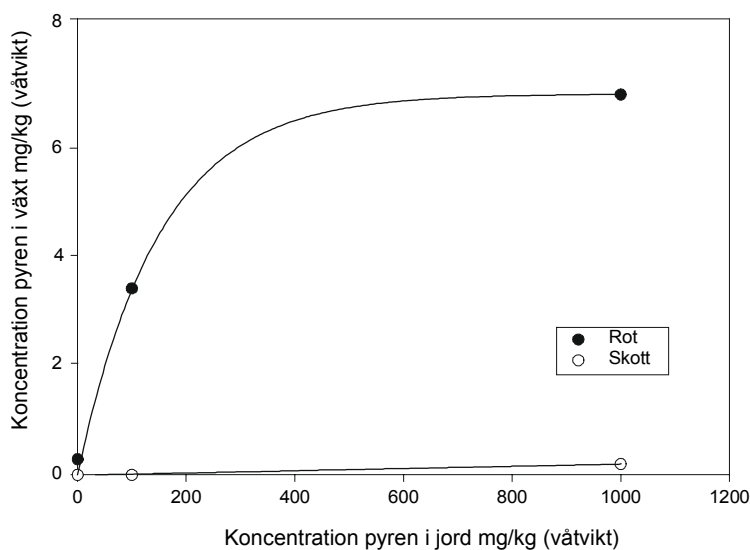
En kreosotförorenad jord från ett impregneringsverk testades också för upptag i rädisa. Samma jordar som testats för toxicitet mot växter och maskar användes (avsnitt 6.2). För att jorden inte skulle ha toxisk inverkan på rädisan användes en blandning bestående av 80% av jord 31, 1% av jord 32 och resten ren sand. Organhalten mätt som glödningsförlust var 2 % i jordblandningen. Som kontroll användes ren sand.

Gräs från kvarteret Lyftkranen samlades in och analyserades avseende PAH. Avsikten var att jämföra upptag i gräs som växt ”naturligt” på förorenad jord och upptagsförsök med växter utförda på laboratoriet.

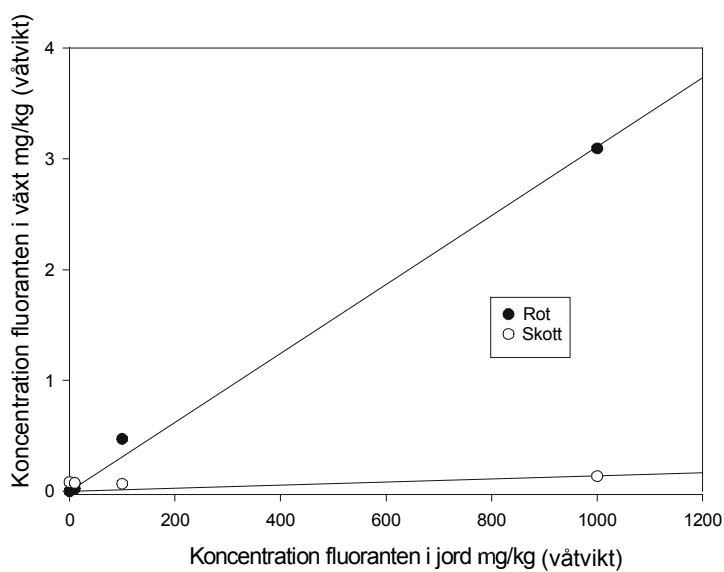
7.7.1 Resultat från upptagstester med rena substanser

Resultaten från försöken med engelskt rajgräs och pyren visar på ett kraftigt upptag i rotdelarna. Upptagskurvan stiger brant men planar sedan ut. Transporten till ”bladen” (de delar som växer ovan jord) är däremot mycket lågt (Figur 13). Även försöken med fluoranten och rädisa visar på kraftigt upptag i rotdelarna. Upptaget är linjärt och visar ingen mättnad i koncentrationer upp till 1000 mg/kg jord. Transporten till blad och stam (ovanjordiska delar) är också här mycket lågt (Figur 14).

Resultaten visar att även föreningar med mycket låg vattenlöslighet tas upp i växterna och ackumuleras i rötterna. Däremot kunde endast mycket låga halter påvisas i bladen. De olika växterna skilde sig också åt i upptagsförmåga. Det är därför viktigt att inte använda ett generellt värde för alla växter när det gäller att bedöma transporten av föroreningar till växter. Det är dock viktigt att påpeka att endast två substanser har testats och endast med två växter.



Figur 13. Uptagsförsök med engelskt rajgräs odla i jord spikad med pyren.



Figur 14. Uptagsförsök med rädisa odlad i jord spikad med fluoranten.

7.7.2 Resultat från upptagstest med kresotförorenad jord

Försök med rädisa odlad i åldrad kresotförorenad jord utfördes. I det här försöket delades provet upp i blad/stam, rot ("själva rädisan") och rottrådar. Halten var högst i rot-

trådarna och rot. I bladen var det inte möjligt att påvisa ett upptag eftersom halterna i exponerad rädisa inte skilde sig från kontrollen. Halten i rottrådarna var mellan 10-250 ggr högre än i roten. Kvoterna mellan halterna i rot / jord, rottrådar / jord och kvoten mellan hel växt och jord för vissa PAHer redovisas i Tabell 10. De värden som finns rapporterade i NV rapport 4639 (1996b) redovisas också.

Tabell 10. Resultat från försök med rädisa odlad på kresotförorenad jord från ett impregneringsverk.

Substans	Halt i jord [#] (mg/kg TS)	Kvot rottråd/jord [#] x 10 ⁻³ ^{###}	Kvot rot/jord [#] x 10 ⁻³ ^{###}	Kvot hel växt/jord [#] x 10 ⁻³ ^{###}	Kpl ^{###} x 10 ⁻³
Naftalen	0,1	<#####	2	1	
Acenaften	7,7	0,5	<	0,04	
Fluoren	5,7	0,3	0,1	0,08	
Fenantren	15	4	<	0,3	
Antracen	5	0,6	<	0,08	
Fluoranten	23	9	0,3	0,9	63
Pyren	12	13	0,5	1	63
Benso[a]antracen	1,4	39	0,2	3	47
Chrysen	3,5	25	0,5	2	47
Benso[b]fluoranten	1,7	39	1	4	6
Benso[k]fluoranten	1,1	46	0,5	4	6
Benso[a]pyren	0,5	120	2	11	38
Indeno[1,2,3-cd]pyren	0,3	110	3	11	29
Dibens[ah]antracen	0,3	24	0,4	2	29
Benso[ghi]perylen	0,4	63	6	9	40

Halten substans i jorden är beräknad på ett medelvärde av startkoncentrationen och slutkoncentrationen i försöket

##(mg/kg våtvikt växt)/(mg/kg jord)

Total biokoncentreringsfaktor enligt tabell A3: 2 i NV rapport 4639 (1996b) (mg/kg våtvikt växt)/(mg/kg jord)

Under detektionsgränsen

Resultaten visar att även om PAHer i åldrad jord binds relativt hårt till det organiska materialet i jorden kan de tas upp av växter. Högsta upptaget kunde konstateras i rottrådarna. Även om halterna i jorden av vissa PAHer t ex de cancerogena benso[a]pyren och dibens[ah]antracen var mycket låga, kunde de tas upp i rädisa. Resultaten visar också på skillnaden mellan de teoretiskt beräknade och de i våra laborieförsök framtagna biokoncentreringsfaktorerna.

Vidare kan det inte uteslutas att PAH metaboliseras av mikroorganismer i jorden och runt rötterna. Metaboliseringen kan leda till bildandet av mer vattenlösliga föreningar som lättare kan tas upp av växternas rötter. Detta innebär en ökad exponering primärt för växten men också i andra hand för primärkonsumenten.

Resultaten visar att utförda upptagsförsök ger ett mått på potentiell biotillgänglighet för beräkning av platsspecifika värden vilka kan användas vid riskbedömning av förorenad mark. Dock bör fler försök utföras med fler testväxter och fler testjordar för att verifiera resultaten. Jordar förorenade med mer vattenlösliga substanser bör även testas.

7.7.3 Upptag i gräs från kreosotförorenad mark

Gräs som växt på den kreosotförorenade marken i kvarteret Lyftkranen insamlades. Gräset grävdes upp med rötter och omkringliggande jordklump och togs till laboratoriet för analys. Resultaten redovisas i Tabell 11. Endast kvoten rot / jord anges då det inte kan uteslutas att PAH-halterna i bladen (de ovanjordiska delarna) kommer från upptag från luft och inte från den förorenade jorden.

Tabell 11. Halter av vissa PAHer i kreosotförorenad jord från kvarteret Lyftkranen och kvoten rot / jord från gräs insamlat på området.

Substans	Halt i jord (mg/kg TS)	Kvot rot/jord x 10 ⁻³ (mg/kg växt)/(mg/kg jord)
Fluoranten	26	16
Pyren	22	14
Benso[<i>a</i>]antracen	18	8
Chrysen	24	9
Benso[<i>b</i>]fluoranten	31	6
Benso[<i>k</i>]fluoranten	25	<#
Benso[<i>e</i>]pyren	25	12
Benso[<i>a</i>]pyren	29	7
Perylen	12	9
Indeno[<i>1,2,3-cd</i>]pyren	21	9
Dibens[<i>ah</i>]antracen	7	8
Benso[<i>ghi</i>]perylene	19	10

Under detektionsgränsen

Det relativt höga upptaget i gräsrötterna jämfört med de i laboratoriet utförda försöken kan bero på många olika faktorer, bl a att gräset växt en lång tid på den förorenade marken (lång exponeringstid). Det finns sannolikt också en skillnad i upptagsförmåga mellan olika arter. Skillnaden i jordtyper var stor och spelar troligen en avgörande roll. Detta visar vikten av platsspecifika data för att kunna göra en bra riskanalys.

7.8 Upptag i maskar

Som komplement till upptagsförsöken med växter utfördes ett enkelt upptagsförsök med masken *Enchytraeus crypticus* och fluoranten. Försöket utfördes på agarplattor med

testsubstansen ingjuten i agarn. Testkoncentrationerna valdes så att dödlighet och reproduktion inte skulle påverkas under försöksperioden. Ingen skillnad i dödligheten eller antalet lagda och kläckta kokonger mot kontrollen kunde heller påvisas. Resultaten från upptagsförsöket redovisas i Tabell 12.

Tabell 12. Resultat från upptagsförsök med fluoranten och *E. crypticus*.

Fluorantehalt i agarmediet mg/kg (v v)	Halt i mask mg/kg (våt- vikt)	Kvot mask/agar (mg/kg mask)/(mg/kg agar)
Kontroll	<#	
12	170	14
120	1300	11

Detektionsgräns: 10 mg/kg

Resultaten visar att fluoranten kunde påvisas i maskarna efter försöksslutet. Kvoten mask/agar skilde sig inte åt för de olika koncentrationerna. Detta tyder på ett haltberoende upptag i maskarna. Upptag av föroreningar i mask kan innebära en spridning av dessa vidare i näringskedjan. För att kunna belysa frågan ytterligare bör kompletterande försök med hel jord utföras.

8 Sammanfattning och slutsatser

För att kunna göra en riktig riskbedömning av ett förorenat markområde behövs ett bra underlag. Varje område är unikt och måste bedömas efter sina egna förutsättningar. IVL har tagit fram ett testpaket för bedömning av förorenad mark i vilket biologiska tester är en viktig del. Resultat från IVLs tester på jord från ett förorenat område kan användas för att ta fram ekotoxikologiska värden specifika just för det området.

Med de biologiska testerna kan biotillgängligheten av de aktuella föroreningarna bestämmas, dvs hur mycket av den uppmätta (analyserade) föroreningshalten som är tillgänglig för biota och kan utöva toxisk påverkan. De biologiska testerna kan också avslöja förekomsten av okända toxiska ämnen i marken. Upptag och omvandling i biota (växter, maskar) kan mätas i IVLs tester. Härvid erhålls ett realistiskt ekotoxikologiskt värde som kan användas vid riskbedömning.

Det är också möjligt att med de biologiska testerna följa en förorenings öde i marken genom att bestämma dess persistens och eventuella omvandling.

Våra undersökningar visar att:

- Naturligt förekommande marklevande organismer är lämpliga att använda för test av jord.
- Mer än en testart bör användas. Testarterna har olika känslighet. Samma substans kan ge olika utslag på olika arter. Samma art är inte alltid känsligast.
- Testarterna bör väljas från olika nivåer i näringskedjan för säkrare bedömning av påverkan på ekosystemet.
- Testmetoderna bör om möjligt innehålla fler testparametrar ("endpoints") för säkrare bedömning av miljörisker (ex. grobarhet - rot- och skottillväxt; dödlighet - reproduktion (kokonger: antal, kläckning, kläckningstid))
- Vid test bör hel jord användas för erhållande av relevant testresultat. Vid test av vattenextrakt från jorden riskeras att endast den vattenlösliga fraktionen testas och om lösningsmedel används kan mer än den biotillgängliga delen av föroreningen lösas ut.
- Upptagsförsöken visar att olika växter tar upp olika mycket av föroreningarna och att ett teoretiskt framtaget värde baserat på K_{ow} värden (fördelningskoefficient oktanol-vatten) och icke platsspecifika K_d värden (fördelningen vatten-jord) kan bli missvisande.
- Det är viktigt att ange mätosäkerheten för analytiska resultat. I annat fall kan mätresultat lätt tolkas som absoluta vilket aldrig är fallet
- Värden från kemiska analyser för en förorenad mark kan ge en skev bild av farligheten i de fall dessa bara baserar sig på moderföroreningen. Det är viktigt att även beakta de metaboliter som kan bildas. Detta gäller speciellt när man har för avsikt att använda sig av mikrobiologiska metoder för rening av den förorenade jorden.

Våra undersökningar visar att IVLs biologiska tester är lämpliga att använda för att ta fram ekotoxikologiska platsspecifika riktvärden för förorenad mark. Testpaketets utformning med tester på olika nivåer i näringskedjan och olika "endpoints" för testerna gör att det går att få fram relevanta underlag för att göra en riskbedömning av förorenade områden. Resultaten från denna undersökning visar också att teoretiskt framräknade värden eller litteraturvärden framtagna med andra icke marklevande organismer kan vara missvisande.

9 Tillkännagivanden

Ett stort tack riktas till Krister Egelstig, Hans Kronberg, Nils Lindskog och Seemi Martinsson för tillhandahållande av testjordar.

10 Referenser

- Allard A-S, M. Remberger, and A.H. Neilson. 2000. The negative impact of aging on the loss of PAH components in a creosote-contaminated soil. *Int Biodet Biodeg* 46:43-49.
- BIMP, IEC, IFCC, ISO, IUPAC, IUPAP, OIML. 1993. Guide to expression of uncertainty in measurment. ISO, Geneva, Switzerland, ISBN 92-67-10188-9.
- Bingham F T. 1973. Boron in cultivating soils and irregation waters. pp 130-131. In Trace elements in the environment (Ed E L Kothney). *Advaces in Chemistry Series 123*. ACS Washington D: C.
- Carbonell-Barrachina A A, F Burló, D Valero, E López, D Martínez-Romero, and F Martínez-Sánchez. 1999. Arsenic Toxicity and accumulation in turnip as affected by arsenic chemical speciation. *J Agric Food Chem* 47: 2288-2294.
- Fortkamp U, K Tjus och G Bergman. 2002. Bedömning av förorenad mark - Utveckling av laktest som del av ett bedömningskoncept. B 1485. IVL, Stockholm, Sweden
- Hoagland D. R., and D. I. Arnon. 1950. The water-culture method of growing plants without soil. *Calif Agr Expt Sta Circ* 347.
- Maliszewska-Kordybach B, and B Smreczak. 2000. Ecotoxicological activity of soils polluted with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) – Effect on plants. *Environ Technol* 21: 1099-1110.
- Malmberg M, A-S. Allard och M. Remberger. 1998. Utveckling av biologiska metoder för bedömning av förorenad mark. B 1294 IVL, Stockholm, Sweden
- Meyer S, S Cartellieri and H Steinhart. 1999. Simultaneous determination of PAHs, hetero-PAHs (N, S, O), and their degradation products in creosot-contaminated soils. Method development, validation, and application to hazardous waste sites. *Anal Chem* 71: 4023-4029.

Moody J D, J P Freeman, D R Doerge and C E Cerniglia. 2001. Degradation of phenanthrene and anthracene by cell suspensions of *Mycobacterium* sp. Strain PYR-1. *Appl Environ Microbiol.* **67**:1476-1483.

Mueller, J G, P J Chapman, and P H Pritchard. 1989. Creosote-contaminated sites. Their potential for bioremediation. *Environ Sci Technol* **23**: 1197-1201.

Naturvårdsverket 1996b. Development of generic guideline values, Rapport nr 4639

Naturvårdsverket, 1996a. Generella riktvärden för förorenad mark, Rapport nr 4638

OECD (1993). Guidelines for testing of chemicals. OECD, Paris.